

1/5/1

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI

(c)1998 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010684091

WPI Acc No: 96-181047/199619

XRAM Acc No: C96-057169

Sepn. of von Willebrand factor into high and low mol. wt. fractions - by affinity chromatography, and the new isolated fractions for treating haemophilia A or von Willebrand disease

Patent Assignee: IMMUNO AG (IMMO)

Inventor: DORNER F; FISCHER B; MITTERER A

Number of Countries: 015 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
EP 705846	A1	19960410	EP 95115442	A	19950929	C07K-014/755	199619 B
DE 4435392	A1	19960411	DE 4435392	A	19941004	C07K-014/745	199620
CA 2159702	A	19960405	CA 2159702	A	19951002	C12N-015/12	199629
JP 8119997	A	19960514	JP 95257467	A	19951004	C07K-014/745	199629

Priority Applications (No Type Date): DE 4435392 A 19941004

Cited Patents: 4.Jnl.Ref

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
--------	------	-----	----	--------------	-------------	--------

EP 705846	A1	G	22			
-----------	----	---	----	--	--	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI NL SE

DE 4435392	A1	16				
------------	----	----	--	--	--	--

JP 8119997	A	12				
------------	---	----	--	--	--	--

Abstract (Basic): EP 705846 A

Sepn. of von Willebrand factor (vWF) into high and low mol. wt. fractions comprises binding vWF to an affinity column and carrying out elution at different salt concns. Also new are: (1) low mol. wt. fraction (A) of vWF, consisting mainly of dimers and tetramers and (2) high mol. wt. fraction (B) of at 50 (pref. 60)% increased activity (per mug. of protein) in platelet aggregation compared with the physiological mixt. of both forms.

USE - (A), (B) and their mixts. are used to treat haemophilia A and the various forms of von Willebrand disease.

ADVANTAGE - The method allows fractionation of vWF on a preparative, rather than analytical scale, and provides high yields of both (A) and (B). Both fractions prepd. from recombinant vWF have greater binding capacity for factor VIII than corresponding plasma fractions. They stabilise factor VIII and improve its storage stability.

Dwg.0/8

Title Terms: SEPARATE; FACTOR; HIGH; LOW; MOLECULAR; WEIGHT; FRACTION; AFFINITY; CHROMATOGRAPHY; NEW; ISOLATE; FRACTION; TREAT; HAEMOPHILIA; DISEASE

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): C07K-014/745; C07K-014/755; C12N-015/12

International Patent Class (Additional): A61K-035/16; A61K-038/37;

A61K-038/43; C07K-001/22

File Segment: CPI

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 705 846 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
10.04.1996 Patentblatt 1996/15

(51) Int. Cl.⁶: **C07K 14/755, A61K 38/37**

(21) Anmeldenummer: 95115442.6

(22) Anmeldetag: 29.09.1995

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI NL SE

(30) Priorität: 04.10.1994 DE 4435392

(71) Anmelder: IMMUNO AG
A-1221 Wien (AT)

(72) Erfinder:
• Fischer, Bernhard, Dr.
A-1120 Wien (AT)

• Mitterer, Artur, Dr.
A-2304 Orth/Donau (AT)
• Dörner, Friedrich, Prof. Dr.
A-1230 Wien (AT)

(74) Vertreter: Kolb, Helga, Dr. Dipl.-Chem. et al
Hoffmann, Eitle & Partner,
Patent- und Rechtsanwälte,
Arabellastrasse 4
D-81925 München (DE)

(54) **Hochmolekulare und niedermolekulare Fraktionen des von Willebrand-Faktors**

(57) Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Trennung von vWF in hochmolekularen vWF und niedermolekularen vWF, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man den vWF an einem Affinitätsträger bindet und dann bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluiert.

EP 0 705 846 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein verfahren zur Auftrennung von von Willebrand-Faktor in eine hochmolekulare und niedermolekulare Fraktion.

Weiterhin bezieht sich die Erfindung auf eine niedermolekulare Fraktion von von Willebrand-Faktor (vWF) Molekülen, eine hochmolekulare Fraktion von von Willebrand-Faktor Molekülen, sowie eine Mischung aus vWF-Molekülen der niedermolekularen und hochmolekularen Fraktion.

Dem von Willebrand-Faktor kommen in der normal ablaufenden Blutgerinnung direkte und indirekte Aufgaben zu. Er bindet in einem Komplex an den Faktor VIII. Dieser Komplex dient zur Stabilisierung des Faktors VIII. Dieser stabilisierte Faktor VIII hat dann wesentliche Cofaktorfunktion bei der Aktivierung von Faktor X. Der von Willebrand-Faktor greift aber auch direkt in die Blutgerinnung ein, indem er die Plättchenaggregation an verletzten Gefäßen vermittelt.

Im Plasma zirkuliert der vWF in einer Konzentration von 5-10 mg/l in Form eines nicht-kovalenten Komplexes mit dem Faktor VIII. Der vWF ist ein Glycoprotein, welches in verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers gebildet und später in die Zirkulation freigesetzt wird. Dabei wird in den Zellen ausgehend von einer Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 220000 (vWF-Monomer) durch Ausbildung von mehreren Schwefelbrücken ein vWF-Dimer (primäres vWF-Dimer) mit einem Molekulargewicht von ca. 550000 gebildet. Aus den vWF-Dimeren werden dann durch Verknüpfung weitere Polymere des vWF mit immer höheren Molekulargewichten bis zu ca. 20 Millionen hergestellt.

Es gibt mehrere Krankheitsbilder, die auf Unter- oder Überproduktion des von Willebrand-Faktors zurückzuführen sind. So führt zum Beispiel eine Überproduktion von vWF zur vermehrten Neigung von Thrombosen, wohingegen eine Unterversorgung mit vWF eine vermehrte Blutungsneigung oder verlängerte Blutungszeit zur Folge hat.

Das von Willebrand-Syndrom kann sich in mehreren Erscheinungsformen manifestieren. Alle Formen zeichnen sich durch eine verlängerte Blutungszeit aus, die entweder durch absolutes Fehlen eines funktionellen vWF oder durch ein abnormes Spektrum in der Multimerenzusammensetzung des vWF begründet ist. Dabei wurden sowohl Formen der von Willebrand Disease diagnostiziert, bei denen die Multimerenbildung reduziert ist, als auch Formen, bei denen die niedermolekularen vWF-Moleküle kaum vorhanden sind. Andere Formen wiederum zeigen zwar hoch- und niedermolekulare vWF-Moleküle, ihre Konzentration beziehungsweise ihr Verhältnis zueinander ist aber gegenüber einer gesunden Person drastisch verringert beziehungsweise verändert.

Der Mangel an vWF kann auch eine Hämophilie A hervorrufen, da der vWF, wie oben erwähnt, ein wesentlicher Bestandteil des funktionellen Faktors VIII ist. In diesen Fällen ist die Halbwertszeit des Faktors VIII derart verringert, dass er seine speziellen Funktionen in der Blutgerinnungskaskade nicht wahrnehmen kann.

Sowohl alle Erscheinungsformen des von Willebrand-Syndroms als auch die auf den Mangel an vWF zurückzuführende Form der Hämophilie A wurden bisher durch Ersatz des fehlenden vWF durch intravenöse Infusionen mit Konzentraten aus Blutplasma, die entweder vWF-Faktor VIII-Komplex oder angereicherten vWF enthalten, behandelt. In beiden Krankheitsfällen ist zwar einerseits die Gabe von Faktor VIII nicht notwendig, die präparative Abtrennung des vWF von Faktor VIII aber technisch sehr schwierig bis unmöglich.

Um die genaue Funktion der hochmolekularen vWF-Moleküle einerseits und der niedermolekularen vWF-Moleküle andererseits zu eruieren, suchte man Wege, diese Fraktionen in angereicherter Form zu gewinnen. Wagner D.D. et al (J. Cell Biol. 101:112, 1985) verhindern durch Zugabe von Monensin in vitro die Multimerenbildung und schliessen aus verschiedenen Versuchen, dass die niedermolekulare Form des vWF nicht funktionell ist. Dahingegen können Senogles S.E. et al (J. Biol. Chem. 258:12327, 1983) keine Funktionsunterschiede in der Ristocitin vermittelten Plättchenaggregation bei hochmolekularen und niedermolekularen Formen des vWF finden. Sie erhalten die niedermolekularen Formen durch Reduktion der Schwefelbrücken von hochmolekularen vWF-Molekülen. Aihara M. et al (Tohoku J. exp. Med. 153:169, 1985) beobachten eine geringere Bindungsfähigkeit der vWF-Moleküle von Patienten mit Willebrand-Syndrom der Type IIa an Collagen in einer Affinitätschromatographie. Diese Art des von Willebrand-Syndroms ist durch das Fehlen der hochmolekularen Moleküle des vWF charakterisiert.

In der Literatur gibt es zahlreiche Verfahren, die eine analytische Trennung von hochmolekularen und niedermolekularen Formen des von Willebrand-Faktors beschreiben, um Aussagen über das Mengenverhältnis der beiden Formen zuzulassen. Als Beispiel sei hier eine Publikation von Baillo et al in Thrombosis Res. 66:745, 1992 genannt. Ein präparatives Verfahren zur Trennung von niedermolekularen und hochmolekularen Formen wurde bisher jedoch nicht beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein präparatives Verfahren zur Auftrennung von von Willebrand-Faktor (vWF) in eine hochmolekulare und niedermolekulare Fraktion von von Willebrand-Faktor zu entwickeln.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Trennung von vWF, insbesondere von rekombinantem von Willebrand-Faktor, in hochmolekularen vWF und niedermolekularen vWF, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man den vWF an einem Affinitätsträger bindet und dann bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluiert.

Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen 2 bis 13 beschrieben.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Trennung in einem Ca^{2+} -freien Puffersystem durchgeführt. Auf diese Weise lassen sich hochmolekulare vWF-Fractionen oder hochmolekulare rvWF-Fractionen, die eine besonders hohe physiologische Aktivität besitzen, mit guten Ausbeuten erhalten.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen, die Dimere und Tetramere enthält, wobei die Dimere und Tetramere aus identischen vWF-Untereinheiten bestehen. Des weiteren betrifft die Erfindung eine niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen, die nach einem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 13 erhältlich ist.

5 Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen 16 bis 20 beschrieben.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf eine hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen, die eine um mindestens 50%, vorzugsweise 60 % verbesserte Aktivität pro μg Protein in der Plättchenaggregation aufweist, verglichen mit der physiologischen Mischung von hochmolekularen und niedermolekularen vWF-Molekülen. Des weiteren umfasst die Erfindung eine hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen erhältlich nach einem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 13. Die Aktivität pro μg Protein kann erfindungsgemäss noch weiter gesteigert werden.

10 Bevorzugte Ausführungsformen der hochmolekularen Fraktion sind in den Unteransprüchen 23 und 24 beschrieben.

Weiterhin bezieht sich die Erfindung auf eine Mischung aus der niedermolekularen Fraktion von vWF-Molekülen gemäss einem der Ansprüche 14 bis 20 und der hochmolekularen Fraktion von vWF-Molekülen gemäss einem der Ansprüche 21 bis 24 in einem beliebigen Mischungsverhältnis.

15 Eine bevorzugte Ausführungsform ist in Anspruch 26 beschrieben.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der niedermolekularen Fraktion von vWF-Molekülen oder der hochmolekularen Fraktion von vWF-Molekülen oder einer Mischung davon in einem beliebigen Mischungsverhältnis zur Behandlung von Hämophilie A oder verschiedener Formen der von Willebrand Disease.

20 Es war im Hinblick auf den Stand der Technik nicht vorhersehbar, dass die nach einem präparativen Trennungsverfahren erhältlichen Fraktionen bzw. deren Mischung zur Behandlung der genannten Krankheiten geeignet sind.

Gegenstand der Erfindung ist auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die die niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen oder die hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen oder eine Mischung davon in einem beliebigen Mischungsverhältnis in einem physiologisch annehmbaren Träger enthält.

Eine bevorzugte Ausführungsform davon ist im Unteranspruch 29 beschrieben.

25 Das erfindungsgemässe Verfahren eignet sich in gleicher Weise für plasmatischen wie auch rekombinanten vWF (rvWF). Ausgangsmaterial zur Trennung der hoch- und niedermolekularen Fraktionen ist entweder eine vWF angereicherte Plasmafraktion oder ein zellfreies Kulturmedium nach Fermentation tierischer Zellen, aus dem rekombinanter vWF isoliert und vorgereinigt wurde.

Der für die Trennung verwendete vWF kann mit Hilfe jedes bekannten Verfahrens vorgereinigt werden.

30 Gemäss dem erfindungsgemässen Verfahren zur Trennung von vWF und insbesondere rvWF in hochmolekulare und niedermolekulare Fraktionen wird der vWF an einem Affinitätsträger gebunden und dann bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluiert.

Für die Erzielung besonders hoher Ausbeuten wird die Trennung in einem Ca^{2+} -freien Puffersystem durchgeführt.

35 Die niedermolekularen vWF-Fraktionen lassen sich bei einer geringeren Salzkonzentration als die hochmolekularen vWF-Fraktionen eluieren.

Für die Elution sind lösliche ein- und zweiwertige Salze verwendbar. Vorzugsweise wird NaCl verwendet. Calciumsalze sind für die Elution nicht geeignet.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird der vWF bei einer Salzkonzentration von $< 150 \text{ mM}$ an den Affinitätsträger gebunden. Bei einer Salzkonzentration zwischen 150 und 250 mM, und insbesondere bei 160 mM, werden dann 40 die niedermolekularen Aggregate des vWFs eluiert, und danach bei einer Salzkonzentration von $> 250 \text{ mM}$ und insbesondere bei $\approx 270 \text{ mM}$ die hochmolekularen Aggregate eluiert.

Bevorzugt wird NaCl als Salz verwendet. Calciumsalze sind nicht geeignet.

Das erfindungsgemässe Verfahren wird vorzugsweise an einer Heparin-Affinitätschromatographie-Säule durchgeführt. Für die Affinitätschromatographie kann jeder Träger, an dem Heparin gebunden werden kann, verwendet werden.

45 Als gut geeignet erwiesen sich zum Beispiel AF-Heparin-Toyopearl® (ein synthetisches, grossporiges, hydrophiles Polymer auf der Basis von Methacrylat (Tosohaas), Heparin EMD-Fraktogel® (ein synthetisches, hydrophiles Polymer auf der Basis von Ethylenglykol, Methacrylat und Dimethylacrylat) (Merck) oder Heparin Sepharose Fast Flow® (enthaltend natürliche Dextran- bzw. Agarosederivate) (Pharmacia).

Die Affinitätschromatographie wird vorzugsweise in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,5, und insbesondere bei einem 50 pH-Wert von 7,4, durchgeführt.

Im erfindungsgemässen Verfahren wird als Puffersystem eine Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen, insbesondere Tris/HCl-Puffer, Phosphatpuffer oder Citratpuffer, und gegebenenfalls Salz verwendet, die vorzugsweise frei von Stabilisatoren, Aminosäuren und anderen Zusätzen ist. Es hat sich gezeigt, dass bei einer mit EDTA behandelten vWF-Lösung in einem Ca^{2+} -freien Puffersystem eine besonders gute Trennung von niedermolekularen und hochmolekularen vWF-Proteinaggregaten erzielt werden kann. Auf diese Weise lassen sich deshalb auch die hochmolekularen vWF-Fraktionen oder hochmolekularen rvWF-Fraktionen, denen eine besonders hohe physiologische Aktivität zukommt, mit guten Ausbeuten erhalten.

Bei dem erfindungsgemässen Verfahren wird vorzugsweise ein rekombinantes vWF-Konzentrat aus zellfreien Kulturüberständen transformierter Zellen eingesetzt.

Nach dem erfindungsgemässen Verfahren zur Trennung von vWF in hochmolekulare und niedermolekulare Fraktionen lassen sich auf effiziente und einfache Weise niedermolekularer und hochmolekularer vWF erhalten. Nach diesem Trennverfahren lässt sich deshalb die physiologisch besonders aktive und somit zur Behandlung von Hämophilie A und verschiedener Formen der von Willebrand Disease hervorragend geeignete hochmolekulare oder niedermolekulare Fraktion von vWF mit guten Ausbeuten herstellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform gemäss der vorliegenden Erfindung wird gereinigter vWF in hochmolekularen vWF und niedermolekularen vWF aufgetrennt.

Der für die Trennung eingesetzte vWF kann mit Hilfe jedes bekannten Verfahrens vorgereinigt werden.

Besonders bevorzugt ist der gereinigte von Willebrand-Faktor nach einem Verfahren erhältlich, welches die Stufen umfasst, dass man plasmatischen von Willebrand-Faktor durch eine Anionenaustauschchromatographie an einem Anionenaustauscher vom quaternären Aminotyp und eine Affinitätschromatographie an immobilisiertem Heparin in einer Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen und ggf. Salz chromatographisch reinigt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der gereinigte von Willebrand-Faktor nach einem Verfahren erhältlich, welches die Stufen umfasst, dass man rekombinanten von Willebrand-Faktor durch eine Anionenaustauschchromatographie an einem Anionenaustauscher vom quaternären Aminotyp und eine Affinitätschromatographie an immobilisiertem Heparin in einer Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen und ggf. Kochsalz chromatographisch reinigt.

Besonders bevorzugt ist der gereinigte von Willebrand-Faktor nach einem Verfahren erhältlich, bei dem ein vWF-Konzentrat aus zellfreien Kulturüberständen transformierter Zellen gereinigt wird.

Als Pufferlösung wird bei der Reinigung von vWF bevorzugt ein von Stabilisatoren, Aminosäuren und anderen Zusätzen freies Puffersystem verwendet.

Bevorzugt wird die Anionenaustauschchromatographie und/oder die Affinitätschromatographie in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,5, und bevorzugter bei einem pH-Wert von 7,4, durchgeführt.

Der bei der Anionenaustauschchromatographie an den Anionenaustauscher und bei der Affinitätschromatographie an immobilisiertes Heparin gebundene von Willebrand-Faktor kann durch Erhöhung der Salzkonzentration eluiert werden.

Bevorzugt ist der quaternäre Anionenaustauscher ein Fraktogel mit Tentakelstruktur, insbesondere ein EMD-TMAE-Fraktogel.

Bei dem Reinigungsverfahren wird insbesondere der vWF an den Anionenaustauscher bei einer Salzkonzentration von ≤ 270 mM NaCl gebunden, und bei einer Salzkonzentration > 270 mM NaCl, und vorzugsweise > 280 mM NaCl eluiert.

Die Affinitätschromatographie wird bei der Reinigung des vWF vorzugsweise an einem Träger mit daran gebundenem Heparin durchgeführt, wobei sich bevorzugt AF-Heparin-Toyopearl® (Tosohaas), Heparin EMD-Fraktogel® (Merck) und Heparin Sepharose Fast Flow® (Pharmacia) gleichermassen eignen.

In einer besonderen Ausführungsform ist der gereinigte von Willebrand-Faktor nach einem Verfahren erhältlich, bei dem der in der Anionenaustauschchromatographie vorgereinigte vWF an das immobilisierte Heparin bei einer Salzkonzentration < 150 mM NaCl bindet und bei einer Salzkonzentration > 150 mM NaCl, vorzugsweise bei 200 bis 300 mM NaCl, bevorzugter 160 bis 270 mM NaCl eluiert wird.

Es ist von Vorteil, als Ausgangsmaterial zur Trennung von hochmolekularem und niedermolekularem vWF bereits gereinigte Konzentrate heranzuziehen. Das chromatographische Trennungsverfahren bewirkt noch zusätzlich einen weiteren Reinigungseffekt.

Die nach dem erfindungsgemässen Trennungsverfahren erhaltenen hochmolekularen und niedermolekularen Fraktionen sowie Mischungen der beiden Fraktionen in jedem Mischungsverhältnis sind physiologisch aktiv und können für therapeutische Zwecke eingesetzt werden.

Die niedermolekulare Fraktion an vWF-Molekülen ist dadurch gekennzeichnet, dass sie vorwiegend Dimere und Tetramere enthält, die aus identischen vWF-Untereinheiten bestehen.

In der niedermolekularen Fraktion ist der Anteil an Dimeren und Tetrameren höher als in der physiologischen Zusammensetzung des vWF.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass niedermolekulare Fraktionen von rekombinanten aus identischen vWF-Untereinheiten bestehen, wogegen Fraktionen von plasmatischem vWF aus einer Mischung von Dimeren oder Tetrameren mit unterschiedlichen Untereinheiten bestehen.

Die niedermolekulare Fraktion an vWF-Molekülen ist nach einem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 13 erhältlich.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen mindestens 83 % Dimere und maximal 16 % Tetramere und maximal 1 % höhere Polymere. Die niedermolekulare Fraktion ist frei von Plättchen aggregierender Wirkung, bindet Faktor VIII, trägt zur Stabilisierung von Faktor VIII bei und beeinflusst die Lagerstabilität von Faktor VIII positiv.

Die niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen besteht vorzugsweise aus rekombinanten vWF.

Die hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen, weist eine um mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 60 % verbesserte Aktivität pro µg Protein in der Plättchenaggregation verglichen mit der physiologischen Mischung von hochmolekularen und niedermolekularen vWF-Molekülen auf.

Die hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen ist nach einem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 13 erhältlich.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die hochmolekulare Fraktion von rekombinantem vWF Multimer enthält, die aus identischen vWF-Untereinheiten bestehen, wogegen Fraktionen von plasmatischem vWF aus einer Mischung von Multimeren mit unterschiedlichen Untereinheiten bestehen.

Die hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen besteht vorzugsweise aus rekombinanten vWF.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass sowohl die niedermolekulare als auch die hochmolekulare Fraktion von rekombinantem vWF eine potentiell höhere Bindungskapazität an Faktor VIII im Vergleich zu entsprechenden Fraktionen des plasmatischen vWF besitzt. Die Fraktionen des rekombinanten vWF binden daher Faktor VIII effizienter als die plasmatischen Fraktionen.

Die unterschiedliche Verwendung der hochmolekularen bzw. der niedermolekularen Fraktion ergibt sich aus ihrer physiologischen Aktivität. Die Möglichkeit der Herstellung von gezielten Mischungen der beiden Fraktionen erlaubt die Behandlung von speziellen medizinischen Indikationen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung der niedermolekularen Fraktion von vWF-Molekülen oder der hochmolekularen Fraktion von vWF-Molekülen oder einer Mischung davon zur Behandlung von Hämophilie A oder verschiedener Formen der von Willebrand Disease.

Insbesondere sei darauf hingewiesen, dass bei Verwendung eines rekombinanten vWF in dem erfindungsgemässen Trennungungsverfahren die Endprodukte (hochmolekulare und niedermolekulare Fraktion, sowie Mischungen der beiden Fraktionen in jedem Mischungsverhältnis) frei von Plasmaproteinen und frei von Faktor VIII sowie frei von pathogenen Viren sind. Dieses kann bei der Herstellung von pharmazeutischen Produkten, wie sie oben genannt sind, für bestimmte medizinische Indikationen von grossem Vorteil sein.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die die niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen oder die hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen oder eine Mischung davon in einem beliebigen Mischungsverhältnis in einem physiologisch annehmbaren Träger enthält.

Vorzugsweise enthält die pharmazeutische Zusammensetzung Faktor VIII oder funktionelle Deletionsmutante(n) von Faktor VIII, wobei die vWF-Moleküle der hochmolekularen Fraktion oder der niedermolekularen Fraktion oder der Mischung davon Faktor VIII oder funktionelle Deletionsmutante(n) von Faktor VIII stabilisieren.

Zur Herstellung pharmazeutischer Präparationen werden die jeweiligen Fraktionen oder deren Mischungen vorzugsweise aufkonzentriert und das Konzentrat weiter verarbeitet.

Die Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzungen kann auf an sich bekannte und übliche Weise erfolgen. Vorzugsweise werden die Produkte (niedermolekulare und hochmolekulare Fraktionen sowie jede mögliche Mischung davon) oder die diese enthaltenden Konzentrate mit einem geeigneten physiologisch verträglichen Träger vermischt. Als Träger dient vorzugsweise eine physiologische Kochsalzlösung.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in einer zur Behandlung von Hämophilie A und verschiedener Formen der von Willebrand Disease üblichen und gebräuchlichen Darreichungsform vorliegen; vorzugsweise liegen sie in Form eines zur Infusion geeigneten Präparates vor.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert, ohne sie darauf zu beschränken.

In Beispiel 1 wird die erfindungsgemässe Trennung von hochmolekularen und niedermolekularen vWF-Polymeren mittels Heparin-Affinitätschromatographie gezeigt.

Beispiel 1: Trennung von hoch- und niedermolekularen Formen des von Willebrand-Faktors

Rekombinanter von Willebrand-Faktor (rvWF) in 20 mM Tris-HCl

Puffer (Tris-Puffer), pH 7,4, wurde auf eine Glassäule, welche mit AF Heparin Toyopearl® (Firma Tosohaas) gefüllt war, mit einer Fliessgeschwindigkeit von 1 ml/min/cm² aufgetragen. Die Säule wurde zuerst mit Tris-Puffer gespült, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Dann wurde die Säule mit 160 mM NaCl in Tris-Puffer und nachfolgend mit 270 mM NaCl in Tris-Puffer eluiert. Während der Chromatographie wurde die Proteinabsorption in üblicher Weise bei 280 nm verfolgt. Nach der Chromatographie wurde die Proteinkonzentration mittels der Bradford Methode (M. Bradford, Anal. Biochem. 72:248-254, 1976) bestimmt. Der Gehalt an rvWF wurde mittels eines handelsüblichen ELISA Systems (Boehringer Mannheim) bestimmt. Die Verteilung der Multimerenstrukturen des rekombinanten von Willebrand-Faktors in den einzelnen Reinigungsfractionen wurde durch SDS-Agarosegelelektrophorese in üblicher Weise untersucht und durch Densitometrie quantitativ ausgewertet. Die Fähigkeit zur Ristocetin vermittelten Blutplättchenaggregation wurde mittels eines handelsüblichen Testsystems (von Willebrand Reagents, Behring Werke) untersucht.

Abbildung 1 zeigt das Multimerenspektrum der einzelnen erhaltenen Fraktionen. Bei einer Salzkonzentration von 160 mM NaCl wurde rvWF mit niedrigem Molekulargewicht, vorwiegend vom Typ primäres Dimer, eluiert. Demgegenüber wurde bei einer Salzkonzentration von 270 mM NaCl rvWF mit hohem Molekulargewicht eluiert.

Abbildung 2 zeigt eine densitometrische Auswertung der Verteilung der Multimeren des bei 160 mM NaCl erhaltenen rekombinanten von Willebrand-Faktors. Diese Auswertung ergab, dass das so erhaltene rvWF-Polymergemisch zu 84,4 % aus dem primären Dimeren (Molekulargewicht ca. 440000) und zu 14,9 % aus dem Tetrameren (Molekulargewicht ca. 880000) besteht.

Eine in Abbildung 3 gezeigte densitometrische Auswertung der rvWF Fraktion, die durch Elution mit 270 mM NaCl erhalten wurde, ergab, dass das so erhaltene rvWF-Polymergemisch aus einer Kaskade von immer höhermolekularen Polymeren besteht.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Chromatographie und erste Funktionsanalysen der rvWF Fraktionen zusammengestellt. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass nahezu der gesamte rvWF an den Träger gebunden wurde. Das mit 160 mM NaCl eluierte rvWF-Polymergemisch (niedermolekular) zeigte keine Fähigkeit zur Agglutination von Blutplättchen. Die bei 270 mM NaCl erhaltene Fraktion (hochmolekular) besaß eine hohe Aktivität in Bezug auf Plättchen-Aggregation. Gegenüber dem Ausgangsmaterial wurde dabei durch die Abtrennung der nicht aggregierenden, niedermolekularen rvWF Formen die spezifische Aktivität in Bezug auf die Agglutination um 69 % gesteigert.

Durch die im Beispiel 1 beschriebene Chromatographie des rvWF am Affinitätssträger wurde gleichzeitig die Reinheit des rvWF wesentlich erhöht. rvWF der 160 mM NaCl-Fraktion zeigte eine doppelte, und rvWF der 270 mM NaCl Fraktion eine 6 fach höhere Reinheit im Vergleich zum Ausgangsmaterial.

Tabelle 1

Probe	Volumen ml	Protein mg/ml	vWF:AG mg/ml	vWF:AG mg	mg vWF:AG/ mg Protein	Agglutination mU/µg Protein	Agglutination mU/µg vWF:AG
rvWF Ausgang	560	0,62	92	51	0,15	0,650	4,3
160 mM NaCl-Eluat	98	0,2	54	6	0,27	0	0
270 mM NaCl-Eluat	86	0,5	440	38	0,88	6,4	7,27

Beispiel 2: Bindung von rekombinanten von Willebrand-Faktor an Faktor VIII

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden in ELISA-Mikrotitrationsplatten durchgeführt, die mit anti vWF Immunglobulin (Asserachrom vWF, Boehringer Mannheim) beschichtet waren. Durch 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 200 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5 % Albumin, 0,1 % Tween 20 (TBS-Puffer), der 100 ng/ml vWF:AG enthielt, wurden jeweils 5 ng vWF an die Reaktionsgefäße gekoppelt. Es wurden folgende vWF Proben verwendet: Humaner vWF (Diagnostika Stago), rvWF (Ausgangsmaterial aus Beispiel 1), niedermolekularer rvWF (160 mM NaCl Elutions-Fraktion aus Beispiel 1), hochmolekularer rvWF (270 mM NaCl Elutions-Fraktion aus Beispiel 1). Die Mikrotitrationsplatten wurden anschliessend 3 mal für 3 Minuten mit TBS gewaschen, und anschliessend wurde jedes Reaktionsgefäß mit 25 µl rekombinanten Faktor VIII (Miles) in TBS überschichtet und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentration des Faktor VIII wurde im Bereich von 100 mU/ml bis 7,12 mU/ml variiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße 3 mal für 3 Minuten mit jeweils 200 µl TBS gewaschen. Anschliessend wurde die durch den immobilisierten vWF gebundene Menge an Faktor VIII mittels eines käuflichen Testsystems (Chromogenix Coatest VIII:C/4) bestimmt.

Abbildung 4 zeigt die Bindung von Faktor VIII an den von Willebrand-Faktor in Abhängigkeit von der angebotenen Faktor VIII Menge. Die Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten vWF Fraktionen den Faktor VIII in einer konzentrationsabhängigen Weise binden, wobei rvWF verglichen mit humanem vWF eine annähernd identische Faktor VIII Bindung zeigte. rvWF der 270 mM NaCl Fraktion aus Beispiel 1 zeigte eine erhöhte Bindung von Faktor VIII, rvWF aus der 160 mM NaCl Fraktion eine geringfügig niedrigere Bindung von Faktor VIII.

Beispiel 3: Stabilisierung von rekombinanten Faktor VIII durch rekombinanten von Willebrand-Faktor.

Faktor VIII wird physiologisch im menschlichen Körper durch den von Willebrand-Faktor gebunden und ist in dieser Form stabil. Demgegenüber wird ungebundener Faktor VIII in wenigen Minuten proteolytisch inaktiviert.

Unterschiedliche Fraktionen von rekombinantem von Willebrand-Faktor, erhalten nach der Methode aus Beispiel 1, wurden transformierten SK-Hep Zellen in Zellkultur zugesetzt, die Faktor VIII sezernieren. Nach 24 Stunden wurden in den Zellkultur-Überständen die Aktivitäten von rekombinantem Faktor VIII mittels eines käuflichen Testsystems (Chromogenix Coatest VIII:C/4) bestimmt. Tabelle 2 stellt die Ergebnisse zusammen.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass durch die Zugabe von rvWF zu den Zellen nach 24 Stunden eine wesentlich höhere Konzentration an Faktor VIII vorhanden war. Sowohl die hochmolekulare vWF Fraktion als auch die niedermolekulare vWF Fraktion binden und stabilisieren den Faktor VIII, wobei die hochmolekulare Fraktion eine bessere Fähigkeit zur Stabilisierung von Faktor VIII hat als die niedermolekulare Fraktion.

Diese Daten zeigen ausserdem, dass durch Zugabe von von Willebrand-Faktor auch rekombinant hergestellter Faktor VIII stabilisiert werden kann.

Tabelle 2

Probe 15 µg/ml	Faktor VIII Aktivität nach 24 Stunden U/ml
Kontrolle	0,5
rvWF Ausgang	1,8
rvWF-160 mM NaCl Eluat	0,8
rvWF-270 mM NaCl Eluat	2,4

Beispiel 4: Stabilisierung von Faktor VIII durch rekombinanten von Willebrand-Faktor

Gemische aus Faktor VIII und rekombinantem von Willebrand-Faktor aus Zellkulturüberständen, wie sie im Beispiel 3 erhalten wurden, wurden bei -20°C eingefroren und für 6 Tage bei -20°C aufbewahrt. Danach wurde wiederum die Aktivität an Faktor VIII bestimmt. Tabelle 3 fasst die Ergebnisse zusammen.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass alle getesteten vWF Fraktionen die Lagerstabilität des Faktors VIII um mehr als das 2,5fache erhöhen. Dieses lässt auch bei der niedermolekularen Fraktion auf eine starke Bindung des vWF-Faktor VIII Komplexes schliessen.

Tabelle 3

Probe 15 µg/ml	Faktor VIII Aktivität (mU/ml)		
	t=0	t=6 Tage	%Verlust
Kontrolle	500	150	70
rvWF Ausgang	1800	1300	28
rvWF-160 mM NaCl Eluat	800	600	25
rvWF-270 mM NaCl Eluat	2400	1800	25

Beispiel 5: Reinigung von rvWF aus Kulturüberständen durch Anionenaustauschchromatographie

Rekombinanter vWF wurde gemäss üblicher Verfahren nach Infektion von Vero Zellen (Affennierenzellen) mit Vaccinia-Virus in Zellkulturtechnik gewonnen. Vero/Vaccinia Expressionssysteme und Zellkulturbedingungen werden in F.G. Falkner et al., Thrombosis and Haemostasis 68 (1992) 119-124, N. Barrett et al., AIDS Res. 5 (1989) 159-171 und F. Dorner et al., AIDS Vaccine Research and Clinical Trials, Marcel Dekker, Inc, New York (1990) ausführlich beschrieben. Die Expression von rvWF erfolgte in synthetischem DMEM-Standardmedium (Dulbeccos minimal essential medium).

Nach der Fermentation der transformierten Zellen wurde das Kulturmedium abgetrennt, und Zellen und Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation entfernt. Weitere kleinere Bestandteile, wie Membranbruchstücke oder Bakterien, wurden durch Filtration durch Filter mit einer Porengrösse von 0,4 µm entfernt.

770 ml zellfreier Kulturüberstand wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/cm²/min über eine Säule (1,6 cm x 5 cm, gefüllt mit 10 ml Anionenaustauscher EMD-TMAE-Fraktogel (Merck)) filtriert. Das Gel wurde zuvor mit 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) equilibriert. Anschliessend wurde die Säule mit 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) gewaschen. Fremdstoffe wurden durch Waschen der Säule mit 200 mM NaCl enthaltendem Puffer entfernt. Der rvWF wurde dann

mit 280 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) vom Träger eluiert. Schliesslich wurde mit 1 M NaCl eventuell vorhandenes Restmaterial von der Säule eluiert. Während der Chromatographie wurde die Proteinabsorption in üblicher Weise bei 280 nm verfolgt. Nach der Chromatographie wurde die Proteinkonzentration nach der Bradford Methode (M. Bradford, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254) bestimmt. Der Gehalt an rvWF wurde mittels eines handelsüblichen ELISA Systems (Boehringer Mannheim) bestimmt.

Es wurde gefunden, dass nahezu der gesamte rvWF an den Träger gebunden wurde. rvWF wurde durch 0,28 M NaCl vom Anionenaustauscher eluiert. Die Ergebnisse der Reinigung von rvWF am Anionenaustauscher sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Durch die in diesem Beispiel beschriebene Reinigung wurde der rvWF um das 6-fache angereichert.

Tabelle 4

Probe	Volumen (ml)	Gesamtprotein (µg/ml)	rvWF (µg/ml)	rvWF/ Gesamtprotein
Zellfreier Kulturüberstand	770	113	7,9	0,069
Elution mit 200 mM NaCl	95	147	0,0016	0,00001
Elution mit 280 mM NaCl	75	168	61	0,36
Elution mit 1 M NaCl	50	196	6	0,03

Beispiel 6: Reinigung von rvWF durch Affinitätschromatographie

Ein nach Beispiel 5 erhaltener rvWF wurde zur Verringerung der Salzkonzentration (160 mM NaCl) mit 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) verdünnt. Anschliessend wurde die Lösung durch eine Säule (1,6 cm x 5 cm, gefüllt mit 10 ml AF Heparin Toyopearl 650 (Tosohaas)) mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/cm²/min filtriert. Die Säule war zuvor mit 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) equilibriert worden. Unspezifisch gebundene Proteine wurden zuerst durch Waschen mit 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) entfernt. rvWF wurde durch 270 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) vom Träger eluiert. Schliesslich wurde mit 1 M NaCl Restmaterial von der Säule eluiert. Während der Chromatographie wurde die Proteinabsorption in üblicher Weise bei 280 nm verfolgt. Nach der Chromatographie wurde die Proteinkonzentration mittels der Bradford Methode (M. Bradford, l.c.) bestimmt. Der Gehalt an rvWF wurde mittels eines handelsüblichen ELISA Systems (Boehringer Mannheim) bestimmt.

Es wurde gefunden, dass nahezu der gesamte rvWF an den Träger gebunden wurde. Bei der Elution mit 270 mM NaCl wurde der Grossteil des rvWF von der Säule eluiert, während die Waschung mit 1 M NaCl nur noch Spuren von rvWF enthält. Die Ergebnisse dieses Reinigungsschrittes sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Durch diesen Reinigungsschritt wurde der Anteil des rvWF-Proteins zum Gesamtprotein auf über 86 % erhöht.

Mit einer denaturierenden SDS-Proteingelelektrophorese (U.K. Laemmli, Nature 227 (1970) 680-685) und anschliessendem Western-Blot wurde die Fraktion von 270 mM NaCl genauer untersucht.

Wie in Abb. 5 dargestellt, ergab die denaturierende elektrophoretische Analyse, dass durch die im Beispiel 5 und 6 beschriebene Reinigung rvWF in hoher Reinheit gewonnen wurde. Im so gewonnenen Produkt konnten keine anderen Gerinnungsfaktoren, wie z.B. Faktor VIII, nachgewiesen werden.

Tabelle 5

Probe	Volumen (ml)	Gesamtprotein (µg/ml)	rvWF (µg/ml)	rvWF/ Gesamtprotein
rvWF-Konzentrat	225	50	13,9	0,27
Elution mit 270 mM NaCl	43	70	60	0,86
Elution mit 1 M NaCl	32	25	2	0,08

Beispiel 7: Isolierung von plasmatischem undombranem von Willebrand-Faktor mit unterschiedlicher Multi-merisierung und Charakterisierung der Bindung zu Faktor VIII

Rekombinanter von Willebrand-Faktor (r-vWF), von Willebrand-Faktor aus Humanplasma (p-vWF) und von Willebrand-Faktor aus Plasma-Kryopräzipitat (k-vWF) wurde durch Kombination aus Anionen-Austauschchromatographie und Heparin-Affinitätschromatographie gereinigt.

In der Anion-Austauschchromatographie wurde das Ausgangsmaterial (r-vWF: Fermentationsüberstand rekombinanter CHO-Zellen; p-vWF: humanes Citratplasma; k-vWF: Plasmakryopräzipitat) auf eine Fractogel-EMD-TMAE-Säule (Firma Merck) aufgetragen und vWF durch Elution mit 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,0, 280 mM NaCl, erhalten. Anschliessend wurden die Präparate durch Zugabe von 20 mM Tris/HCl-Puffer auf eine Salzkonzentration von 90 mM verdünnt und auf eine Fractogel-EMD-Heparin-Säule (Fa. Merck) aufgetragen. vWF wurde durch eine stufenweise Elution mit zunehmender Salzkonzentration eluiert. Dabei wurde die NaCl-Konzentration in 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,0, zwischen 120 mM und 280 mM variiert. Auf diese Weise wurden sowohl für p-vWF, k-vWF und r-vWF Präparate bei 120 mM NaCl, 160 mM NaCl, 190 mM NaCl, 230 mM NaCl und 280 mM NaCl erhalten, die sich in der Multimerenzusammensetzung voneinander unterscheiden.

Der Gehalt an vWF (vWF-Antigen, vWF:Ag) wurde mittels einem üblichen ELISA-Test bestimmt (Asserachrom vWF, Boehringer Mannheim).

Die Bindung von Gerinnungsfaktor VIII an sowohl p-vWF, k-vWF und r-vWF wurde mittels 'real-time biospecific interaction analysis', basierend auf Messungen der Oberflächen-Plasmon Resonanz-Technologie (Malmqvist M, Natur 1993; 361: 186-187) bestimmt. Dabei wurde das stöchiometrische Verhältnis von vWF-Untereinheiten zu gebundenem Faktor VIII bestimmt: Ein monoklonaler anti-human von Willebrand-Antikörper (AvW82) wurde kovalent an den Sensorchip CM5 (Pharmacia Biosensor AB) gebunden (O'Shannessy D.J. et al, 1993, Anal. Biochem. 212: 457-468; Karlsson R, 1994, Anal. Biochem. 221: 142-151). Die Messung der Resonanz-Einheiten (RU) entspricht dabei der Basislinie (RU_{BL}).

p-vWF, k-vWF und r-vWF wurden in 10 mM HEPES, pH 7,4, 105 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 0,05% Surfactant P 20 (HBS-Puffer) zu einer Konzentration von 20 µg/ml gelöst. Für jedes Experiment wurden 50 µl Proben des vWF über den Sensorchip aufgetragen, mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min, um die Bindung von AvW82 an den vWF zu ermöglichen (Phase A). Nicht gebundener vWF wird durch Spülen mit HBS-Puffer entfernt (Phase B). p-vWF und k-vWF wurden zusätzlich mit 20 µl 250 mM $CaCl_2$ gewaschen, um Spuren von plasmatischem Faktor VIII zu entfernen. Die Bindung von vWF an Av8/2 entspricht der vWF-Resonanz-Einheit (RU_{vWF}). Für die Analyse der Bindung des Faktors VIII wurden 60 µl rekombinanter FVIII (2,5 µg/ml in HBS-Puffer) über den Sensorchip injiziert, bei konstanter Flussrate von 5 µl/min, um die Bindung des Faktors VIII an den vWF zu ermöglichen (Phase C). Die Messung der Resonanzeinheiten entsprechen der FVIII-Bindung (RU_{FVIII}). Durch Spülen mit HBS-Puffer wurde Faktor VIII wieder vom vWF abdissoziiert (Phase D). Das stöchiometrische Verhältnis des Komplexes aus FVIII und vWF-Untereinheit ergibt sich aus den Resonanzeinheiten und den Molekulargewichten: vWF (Untereinheit) : FVIII = $(RU_{vWF} - RU_{BL}) / (RU_{FVIII} - RU_{vWF}) \times 330,000/220,000$ (O'Shannessy D J et al, 1993, Anal. Biochem. 212: 457-468; Karlsson R, 1994, Anal. Biochem. 221: 142-151).

Abb. 6 zeigt das Sensogramm der Anlagerung von r-Faktor VIII an r-vWF.

Tabelle 6

Bestimmung der Stöchiometrie des vWF-Faktor VIII-Komplexes	
Beispiel	Stöchiometrie vWF-Untereinheit : FVIII
r-vWF 120 mM Eluat	2,25 : 1
r-vWF 160 mM Eluat	2,5 : 1
r-vWF 190 mM Eluat	2,0 : 1
r-vWF 230 mM Eluat	2,0 : 1
r-vWF 280 mM Eluat	2,0 : 1
k-vWF 280 mM Eluat	2,6 : 1
P-VWF 280 mM Eluat	3 : 1

Tabelle 6 zeigt die Stöchiometrie von vWF : Faktor VIII von nieder- und hochmolekularen Fraktionen von plasmatischem und rekombinantem vWF. Die Daten zeigen, dass sowohl die niedermolekularen als auch die hochmolekularen Fraktionen von r-vWF eine höhere Bindungskapazität zu Faktor VIII aufweisen als p-vWF.

Beispiel 8: Reinigung und Trennung von plasmatischem vWF, vWF aus Kryopräzipitat und rekombinantem vWF

Plasmatischer vWF (p-vWF), vWF aus Kryopräzipitat (k-vWF) und rekombinanter vWF (r-vWF) wurden mittels Heparin-Affinitätschromatographie gereinigt und die niedermolekularen und hochmolekularen Fraktionen gemäss Beispiel 1 getrennt.

Aus Abb. 7 wird erkennbar, dass die einzelnen Fraktionen von p-vWF und k-vWF wesentlich unschärfere Banden aufweisen als die von r-vWF. Dies wird in Abb. 8 noch wesentlich deutlicher, wo die aufgetrennten Multimere von p-vWF und r-vWF direkt verglichen wurden. Deutlich sichtbar sind die scharfen Banden von r-vWF nach Trennung im SDS-Gel, wogegen bei der Auftrennung von p-vWF eindeutig Zwischenprodukt mit unterschiedlichen Molekulargewichten auftreten. Diese 'Zwischenbanden' sind auf das heterogene Gemisch von verschiedenen grossen vWF-Untereinheiten in den p-vWF-Fractionen zurückzuführen, die durch Verdau mit im Plasma vorkommender Protease entstehen. Diese Zwischenprodukte sind in der Literatur als sogenannte Triplet-Strukturen bekannt.

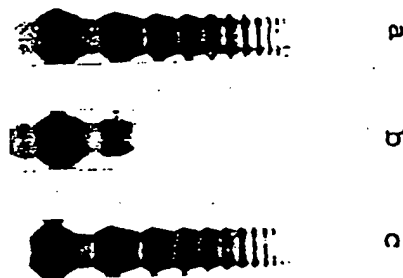
Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung von vWF in hochmolekularen vWF und niedermolekularen vWF, dadurch gekennzeichnet, dass man den vWF an einem Affinitätsträger bindet und dann bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluiert.
2. Verfahren zur Trennung von vWF nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der zu trennende vWF in einer an vWF angereicherten Plasmafraktion vorliegt.
3. Verfahren zur Trennung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der zu trennende vWF rekombinanter vWF ist, der in einem rekombinanten vWF Konzentrat aus zellfreien Kulturüberständen transformierter Zellen vorliegt.
4. Verfahren zur Trennung von vWF nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man gereinigten vWF in hochmolekularen vWF und niedermolekularen vWF auftrennt.
5. Verfahren zur Trennung von vWF in hochmolekularen vWF und niedermolekularen vWF nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man die Trennung in einem Ca^{2+} -freien Puffersystem vornimmt.
6. Verfahren zur Trennung von vWF nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Affinitätsträger ein Träger mit daran gebundenem Heparin ist, wobei sich bevorzugt AF-Heparin Toyopearl® (Tosohaas), Heparin EMD-Fraktogel® (Merck) und Heparin Sepharose Fast Flow® (Pharmacia) gleichermaßen eignen.
7. Verfahren zur Trennung von vWF nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Puffersystem für die Affinitätschromatographie eine Pufferlösung, bestehend aus Puffersubstanzen und ggf. Salz verwendet wird.
8. Verfahren zur Trennung von vWF nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Puffersystem eine Pufferlösung, bestehend aus Tris/HCl-Puffer, Phosphatpuffer oder Citratpuffer, und ggf. Kochsalz verwendet wird.
9. Verfahren zur Trennung von vWF nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Affinitätschromatographie in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,5, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass niedermolekularer vWF bei einer geringeren Salzkonzentration als hochmolekularer vWF eluiert wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man den vWF bei einer Salzkonzentration < 150 mM an den Affinitätsträger bindet, bei einer Salzkonzentration zwischen 150 und 250 mM, vorzugsweise bei 160 mM, niedermolekulare Aggregate des vWF eluiert, und danach bei einer Salzkonzentration von > 250 mM, vorzugsweise ≥ 270 mM, hochmolekulare Aggregate des vWF eluiert.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass als Salze lösliche ein- und zweiwertige Salze verwendet werden.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Salz NaCl verwendet wird.
14. Niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen, dadurch gekennzeichnet, dass sie vorwiegend Dimere und Tetramere enthält.
15. Niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen erhältlich nach einem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 13.

16. Niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen nach Anspruch 14 oder 15, die mindestens 83 % Dimere und maximal 16 % Tetramere und maximal 1 % höhere Polymere enthält.
17. Niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen nach einem der Ansprüche 14 bis 16, die frei ist von Plättchen aggregierender Wirkung.
18. Niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen nach einem der Ansprüche 14 bis 17, die Faktor VIII bindet, zur Stabilisierung von Faktor VIII beiträgt, und die Lagerstabilität von Faktor VIII positiv beeinflusst.
19. Niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen nach einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus plasmatischem vWF besteht.
20. Niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen nach einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus rekombinantem vWF besteht.
21. Hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen, die eine um mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 60 % verbesserte Aktivität pro µg Protein in der Plättchenaggregation aufweist, verglichen mit der physiologischen Mischung von hochmolekularen und niedermolekularen vWF-Molekülen.
22. Hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen erhältlich nach einem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 13.
23. Hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus plasmatischem vWF besteht.
24. Hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus rekombinantem vWF besteht.
25. Mischung aus der niedermolekularen Fraktion von vWF-Molekülen gemäss einem der Ansprüche 14 bis 20 und der hochmolekularen Fraktion von vWF-Molekülen gemäss einem der Ansprüche 21 bis 24 in einem beliebigen Mischungsverhältnis.
26. Mischung nach Anspruch 25, in einem Mischungsverhältnis, in dem der Anteil an niedermolekularem vWF geringer als 35 % oder höher als 45 % ist.
27. Verwendung der niedermolekularen Fraktion von vWF-Molekülen nach einem der Ansprüche 14 bis 20 oder der hochmolekularen Fraktion von vWF-Molekülen nach einem der Ansprüche 21 bis 24 oder einer Mischung davon nach Anspruch 25 oder 26 zur Behandlung von Hämophilie A oder verschiedener Formen der von Willebrand Disease.
28. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie die niedermolekulare Fraktion von vWF-Molekülen nach einem der Ansprüche 14 bis 20 oder die hochmolekulare Fraktion von vWF-Molekülen nach einem der Ansprüche 21 bis 24 oder der Mischung davon nach Anspruch 25 oder 26 in einem physiologisch annehmbaren Träger enthält.
29. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Faktor VIII oder funktionelle Deletionsmutante(n) von Faktor VIII enthält, wobei die vWF-Moleküle der hochmolekularen Fraktion oder der niedermolekularen Fraktion oder der Mischung davon Faktor VIII oder funktionelle Deletionsmutante(n) von Faktor VIII stabilisieren.

Abb. 1

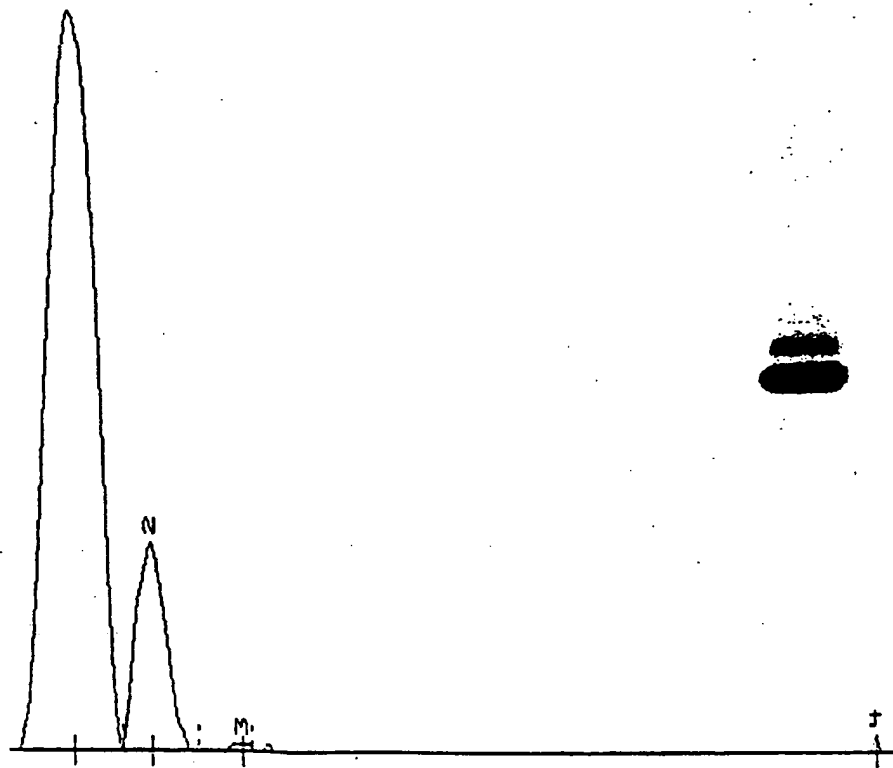
SDS-Agaroseelektrophorese der Fraktionen der
Affinitätschromatographie von rekombinantem von
Willebrand Faktor an immobilisiertem Heparin



Spur a: Ausgangsmaterial an vWF
Spur b: Eluat mit 160 mM NaCl
Spur c: Eluat mit 270 mM NaCl

Abb. 2

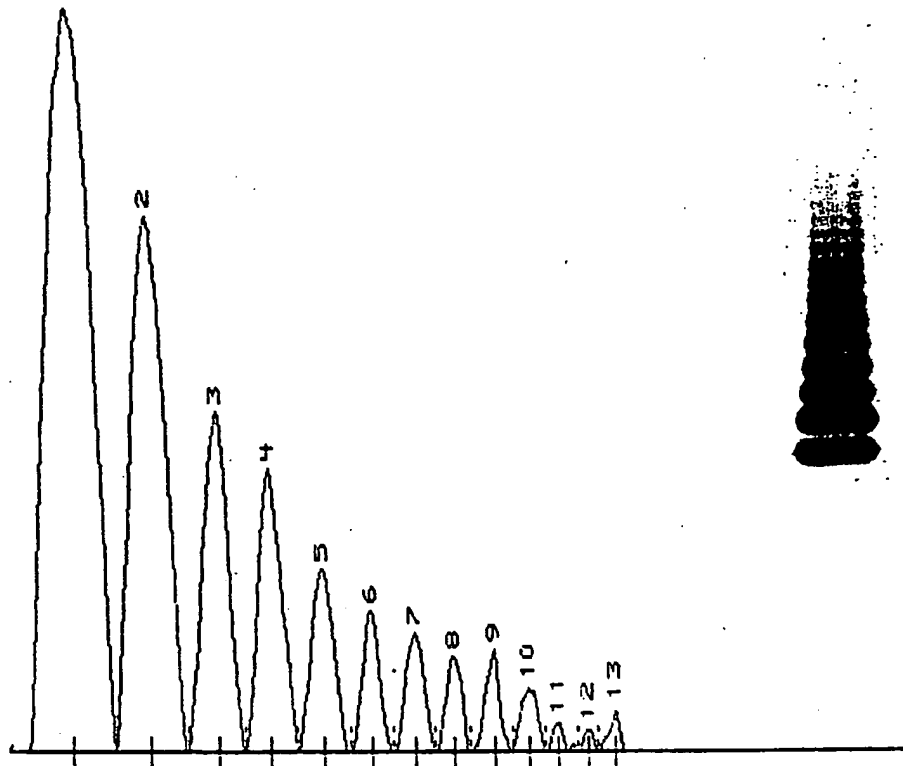
Densitometrische Darstellung der Multimerenzusammensetzung der vWF-Fraktion erhalten durch Elution bei 160 mM NaCl.



SPUR-NUMMER:	38	GESAMTFLÄCHE:	181 497 INCREMENTE		
1 =	84.3 %	0.0 g/l	152 978 Inc	0.60 Ext.	20.7 mm
2 =	14.9 %	0.0 g/l	27 075 Inc	0.17 Ext.	26.4 mm
3 =	0.4 %	0.0 g/l	754 Inc	0.01 Ext.	32.8 mm
4 =	0.4 %	0.0 g/l	690 Inc	0.02 Ext.	78.1 mm

Abb. 3

Densitometrische Darstellung der Multimerenzusammensetzung der vWF-Fraktion erhalten durch Elution bei 270 mM NaCl.



SPUR-NUMMER:

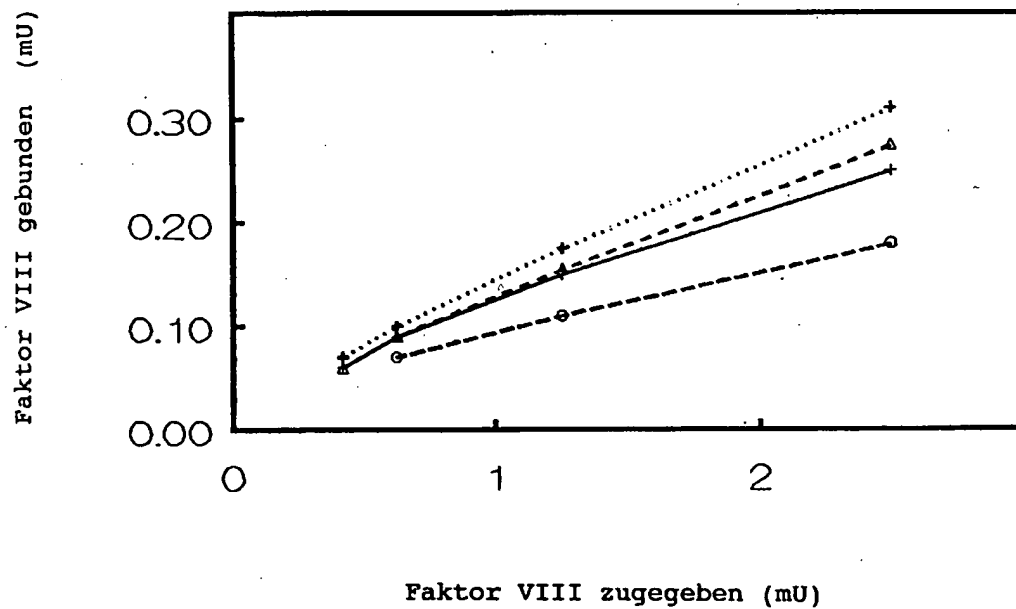
GESAMTFLÄCHE:

204 155 INCREMENTE

1 = 41.3 %	84 314 Inc	0.36 Ext.	20.6 mm
2 = 22.6 %	46 062 Inc	0.26 Ext.	25.1 mm
3 = 10.8 %	21 966 Inc	0.16 Ext.	30.9 mm
4 = 8.2 %	16 643 Inc	0.14 Ext.	34.5 mm
5 = 5.2 %	10 550 Inc	0.09 Ext.	38.3 mm
6 = 3.0 %	6 058 Inc	0.07 Ext.	41.6 mm
7 = 2.8 %	5 799 Inc	0.06 Ext.	44.8 mm
8 = 1.9 %	3 781 Inc	0.05 Ext.	47.5 mm
9 = 1.8 %	3 709 Inc	0.05 Ext.	50.4 mm
10 = 1.3 %	2 736 Inc	0.03 Ext.	52.8 mm
11 = 0.4 %	939 Inc	0.01 Ext.	54.8 mm
12 = 0.3 %	554 Inc	0.01 Ext.	56.9 mm
13 = 0.6 %	1 144 Inc	0.02 Ext.	58.8 mm

Abb. 4

Bindung von Faktor VIII and von Willebrand Faktor



- +— humaner vWF
- △-- rvWF-Ausgang (Beispiel 1)
- rvWF-160 mM NaCl Fraktion (Beispiel 1)
- ...+... rvWF-270 mM NaCl Fraktion (Beispiel 1)

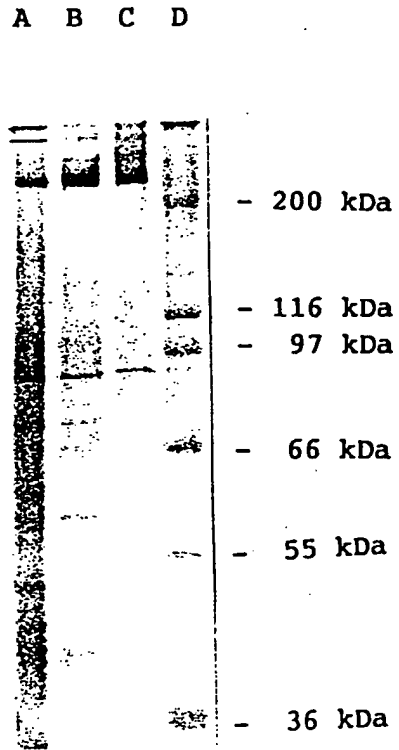


Abb. 5

Abb. 6

Analyse der Kinetik der Interaktion von r-vWF und r-Faktor VIII

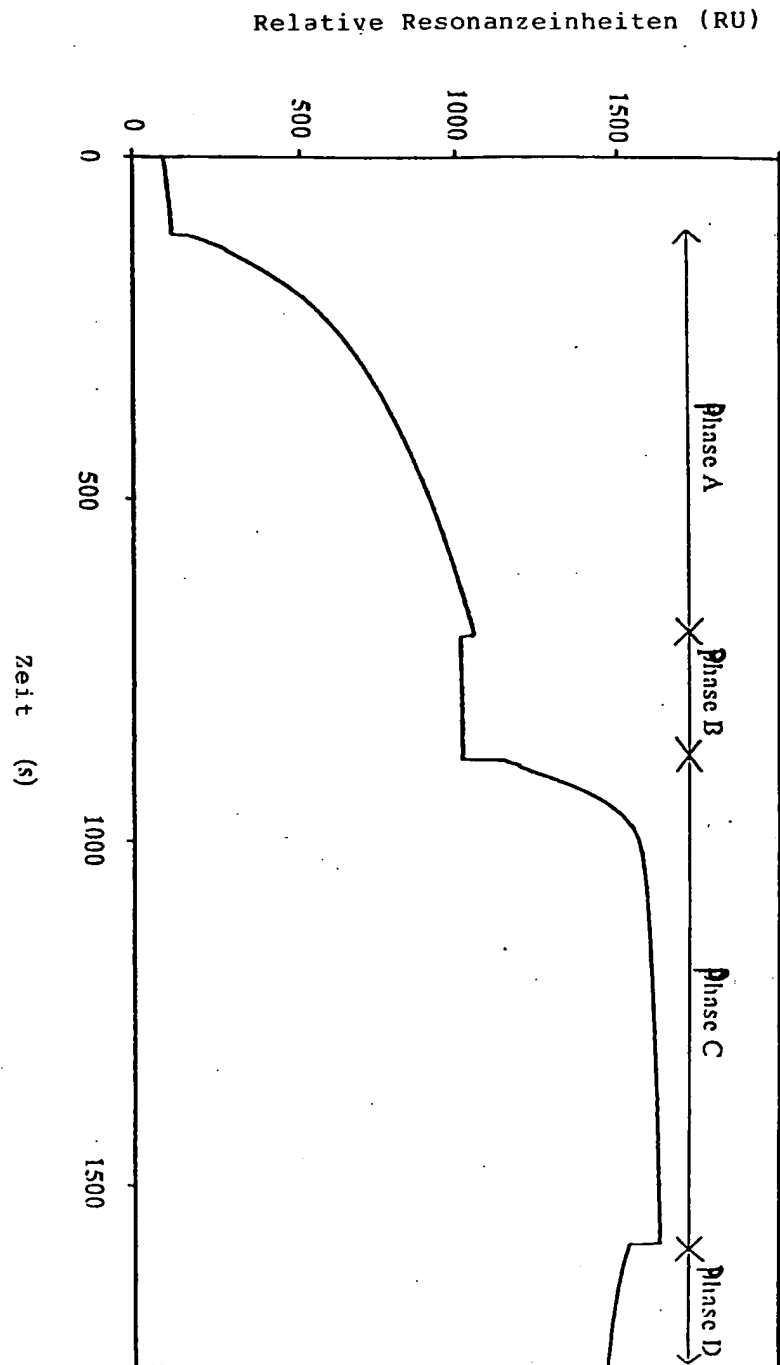
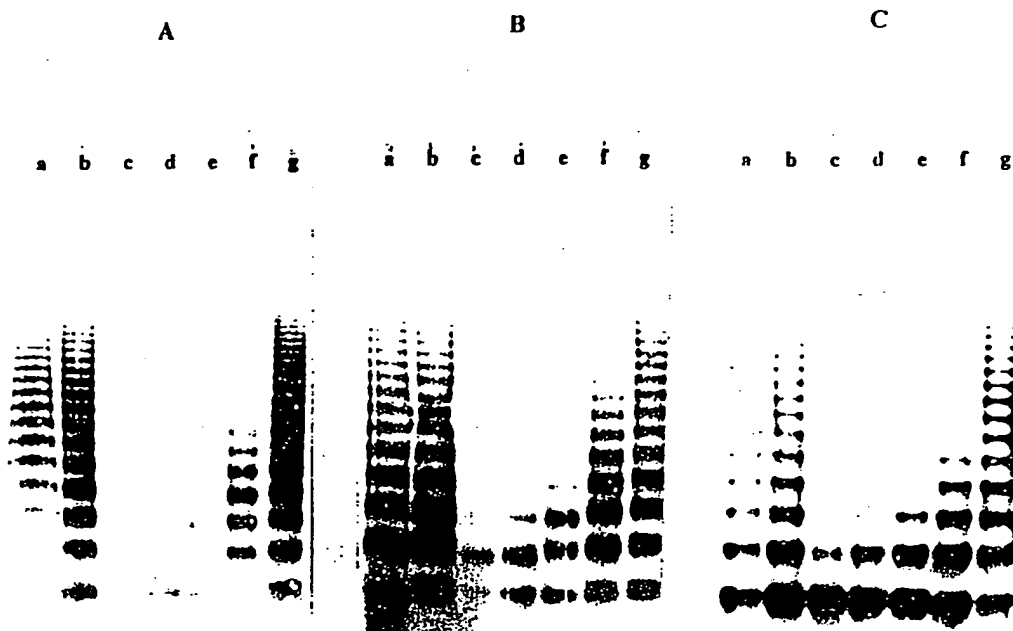


Abb. 7 zeigt SDS-Agarosegelelektrophorese der Fraktionen nach Trennung der vWF Multimere von p-vWF (A), k-vWF (B) und r-vWF mit verschiedenem Grad der Polymerisierung.



Spur a. vWF vor der Reinigung

Spur b. Eluat mit 280 mM NaCl vom Fractogel EMD-TMAE

Spur c. Eluat mit 120 mM NaCl nach Heparin-Affinitätschromatographie

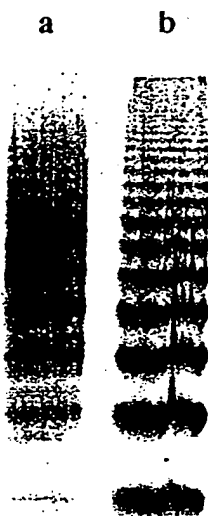
Spur d. Eluat mit 160 mM NaCl nach Heparin-Affinitätschromatographie

Spur e. Eluat mit 190 mM NaCl nach Heparin-Affinitätschromatographie

Spur f. Eluat mit 230 mM NaCl nach Heparin-Affinitätschromatographie

Spur g. Eluat mit 280 mM NaCl nach Heparin-Affinitätschromatographie

Abb. 8 SDS-Agarosegelelektrophorese von p-vWF (a) und r-vWF (b)
nach Affinitätschromatographie und Elution mit 280 mM NaCl.





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT Nummer der Anmeldung
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

EP 95 11 5442

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE		
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch
D,X	<p>JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 101, Nr. 1, Juli 1985 Seiten 112-120, D.D. WAGNER ET AL. 'Inhibition of Disulfide Bonding of von Willebrand Protein by Monensin Results in Small, Functionally Defective Multimers' * Seite 113, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 114, rechte Spalte, Absatz 1; Abbildungen 1,2 * * Seite 116, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 118, rechte Spalte, Absatz 1 * * Seite 119, linke Spalte, Absatz 4 - rechte Spalte, Absatz 3 *</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	14-19
		<p>KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)</p> <p>C07K14/755 A61K38/37</p>
		<p>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)</p> <p>C07K A61K</p>
<p>UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE</p> <p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: Unvollständig recherchierte Patentansprüche: Nicht recherchierte Patentansprüche: Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p style="text-align: center;">Siehe Ergänzungsblatt C</p>		
<p>Recherchenort</p> <p>DEN HAAG</p>	<p>Abschlußdatum der Recherche</p> <p>9. Januar 1996</p>	<p>Prüfer</p> <p>Fuhr, C</p>
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>Δ : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>		

EPO FORM 150 (01.92) (P01C01)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 95 11 5442

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
D,X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), Bd. 258, Nr. 20, 25.Oktober 1983 BALTIMORE, MD US, Seiten 12327-12333, S.E. SENOGLES UND G.L. NELSESTUEN 'von Willebrand Factor' * Seite 12328, linke Spalte, Absatz 2 * * Seite 12332, rechte Spalte, Absatz 1 - Seite 12333, linke Spalte, Absatz 4 *	14-19	
A	FEBIS LETT. (1994), 351(3), 345-8 CODEN: FEBLAL; ISSN: 0014-5793, 12. September 1994 FISCHER, BERNHARD ET AL. 'Structural analysis of recombinant von Willebrand factor: identification of hetero- and homo-dimers' * Seite 347, linke Spalte, Absatz 3 - Seite 348, linke Spalte, Absatz 2; Abbildungen 3,4 *	1-24	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
D,A	THROMBOSIS RESEARCH, Bd. 66, Nr. 6, 15.Juni 1992 Seiten 745-755, P. BAILLOD ET AL. 'Multimeric Analysis of von Willebrand Factor by Vertical Sodium Dodecyl Sulphate Agarose Gel Electrophoresis, Vacuum Blotting Technology and Sensitive Visualization by Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase Complex' * Seite 752, Absatz 2 - Seite 753, Absatz 6 *	1-24	

EPO FORM 1303 03.12 (P04C12)



EP 95 11 5442

- C -

Obwohl der Anspruch 27 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen bzw. tierischen Körpers bezieht, wurde trotzdem eine Suche durchgeführt, die auf den angegebenen Effekten der Verbindung bzw. Zusammensetzung basiert.